

論文内容の要旨

論文題目 カイコ前胸腺に発現する遺伝子 *Cyp307a1* と *HLH54F* のクローニングと機能解析

氏名 並木 俊樹

序論

昆虫が幼虫、蛹を経て成虫へと姿を変化させて成長することの不思議さは、古くから多くの研究者たちの興味をひきつけてきた。昆虫の脱皮変態は科学者の知的好奇心を刺激しただけでなく、遺伝性疾患、組織分化、アポトーシス、老化、概日性、第二次性徴、害虫防除など、多様な研究に応用が可能であるため、脱皮変態を起こす機構の内分泌学、生化学、および分子生物学に関する基礎的な知見を深めようと多大な努力が払われてきた。これまでの研究から、昆虫の脱皮変態には前胸腺が中心的な役割を果たしていることが示されている。前胸腺は昆虫の内分泌器官であり、脱皮変態を促進するステロイドホルモンであるエクジソンの合成と分泌という重要な機能を担っている。エクジソンは前胸腺中でコレステロールが修飾されることで合成、分泌されるが、どのような遺伝子はその過程にかかわるのかについては長い間不明であった。

近年、エクジソン合成量減少と胚期致死の表現型を示すショウジョウバエ変異系統 (Halloween mutant family) から、エクジソン合成にかかわる酵素が相次いでクローニングされた。それらの酵素は *Cyp306a1/phantom*、*Cyp302a1/disembodied*、*Cyp315a1/shadow*、*Cyp314a1/shade* の各チト

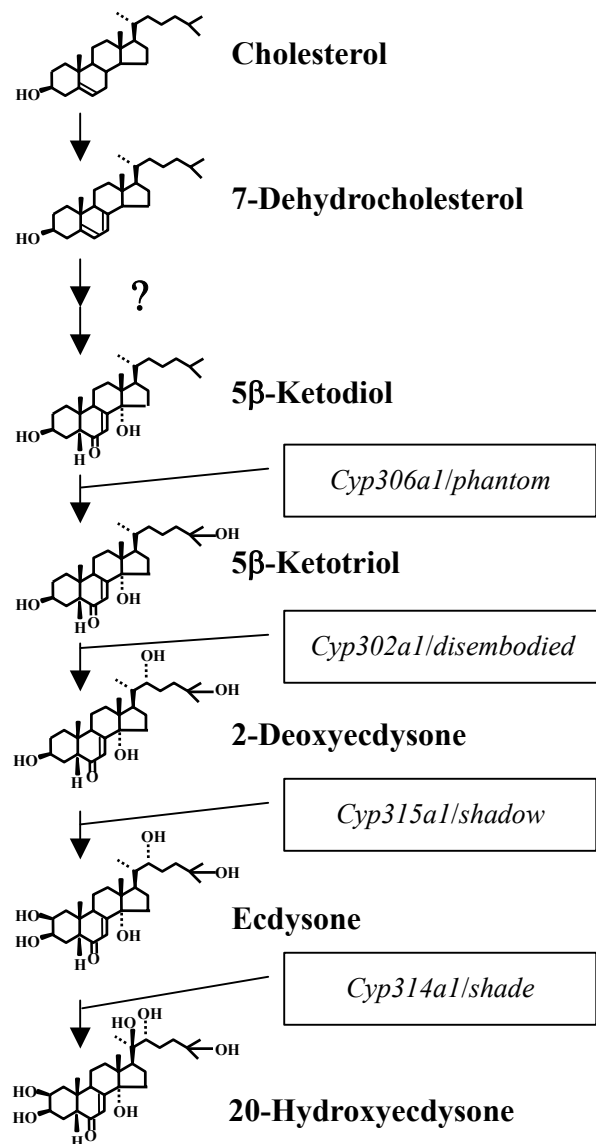


図1 ショウジョウバエのエクジソン合成経路概略図

太字はエクジソン前駆物質、枠内斜体は反応を触媒する酵素を表す。?は反応経路が不明な部分を表す。

クローム P450 モノオキシゲナーゼであった。これらの 4 つの酵素はそれぞれステロイドを水酸化することでエクジソン合成に必須の働きを担っていることが証明され、脱皮変態を調節する機構の解明に大きく貢献した。

本研究では、脱皮変態にかかわる新規遺伝子を解析するため、大型で解剖しやすいカイコ前胸腺から遺伝子をクローニングし、遺伝学的操作が可能なショウジョウバエの相同遺伝子を用いて機能を解析するという戦略をとった。カイコからの遺伝子のスクリーニング手段として、Differential Display 法とカイコ EST データベース検索による解析を行い、前胸腺で特異的に発現する遺伝子のスクリーニングを試みた。その結果、カイコ前胸腺で強い発現が見られる二つの遺伝子、チトクローム P450 モノオキシゲナーゼに属する *Cyp307a1* と、basic-Helix-Loop-Helix (以下 bHLH と略) 型転写因子と考えられている *HLH54F* に注目し解析を進めた。

結果と考察

1. チトクローム P450 モノオキシゲナーゼ *Cyp307a1*

カイコの成長に応じて前胸腺中で発現量の変化する遺伝子のスクリーニングを行うため、異なる成長段階のカイコ前胸腺に対して蛍光 Differential Display を行った。その後、発現量に変化が見られるバンドを PCR で増幅して、cDNA マイクロアレイを作成した。そして、1) 5 齢初期カイコ前胸腺と 5 齢初期カイコ唾液腺、2) 5 齢初期カイコ前胸腺と 5 齢 Wandering 期カイコ前胸腺、3) 5 齢 Wandering 期カイコ前胸腺と 5 齢 Wandering 期カイコ唾液腺、の三通りの組み合わせについて、各組織由来の RNA を DNA アレイとハイブリダイゼーションさせ、Wandering 期の前胸腺特異的に発現量が上昇する遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、チトクローム P450 モノオキシゲナーゼの *Cyp307a1* をクローニングすることができた。

カイコ *Cyp307a1* (以下 *Cyp307a1-Bm* と略) の発現パターンを解析すると、組織別では 5 齢幼虫の前胸腺特異的に発現すること (図 2)、また、時期別ではエクジソンを大量に合成する脱皮直前と Wandering 期の前胸腺において発現量が上昇することが示され (図 3)、エクジソン合成にかかわることが予想された。

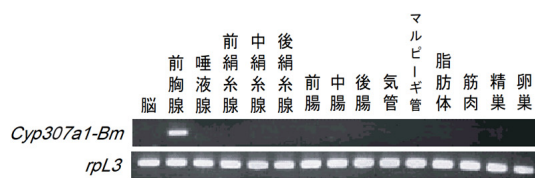


図 2 カイコ 5 齢幼虫の組織別 *Cyp307a1* 発現解析 (RT-PCR)

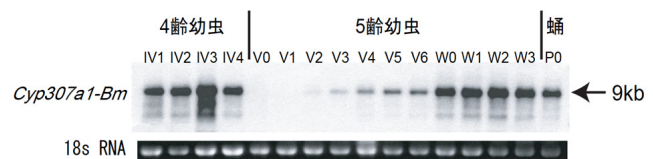


図 3 カイコ幼虫発生段階別 *Cyp307a1* 発現解析 (ノーザンブロットング)

次に、*Cyp307a1* の機能解析を行うためにショウジョウバエを用い、その相同遺伝子 (以下 *Cyp307a1-Dm* と略) の解析を行った。まず、*Cyp307a1* の染色体上の位置の近くに変異を持ち、エクジソン合成に異常をきたす変異系統を探した。その結果、エクジソン合成量減少の表現型を示す Halloween mutant family に属する *spook* という遺伝子座は *Cyp307a1-Dm* に近いことがわかった。この結果から、*Cyp307a1* と *spook* は同一の遺伝子であるという予想を立てた。この予想を検証するため、*spook* 変異系統が持つ *Cyp307a1* の塩基配列を読み、変異の存在を調べたところ、*spook* 変異系統の *Cyp307a1* は、P450 の酵素反応に必須のドメインであるヘム結合モチーフ中にアミノ酸置換を起こす変異が入っていることが明らかになった。

さらに、ショウジョウバエのトランスジェニック系統を作成して Gal4/UAS 系によるレスキュー

一実験を行い、*spook* と *Cyp307a1* が同一遺伝子であるのかどうかを検討した。その結果、*spook* 変異系統に *Cyp307a1-Dm*、*-Bm* を全身で発現させると、ともに *spook* の表現型を回復することが示された(表 1)。この結果から、*Cyp307a1* は *spook* と同一遺伝子であると結論した。そして、*Cyp307a1-Dm*、*-Bm* は同じ生化学反応を触媒することが予想された。

Cyp307a1-Dm をクローニングし、*in situ* ハイブリダイゼーションで発現を確認したところ、エクジソンを合成する組織と考えられる初期胚の羊漿膜と成虫の卵巣での発現が見られた。ところが、胚期と 3 齢幼虫の前胸腺細胞では予想に反して発現が見られなかった。この結果は *Cyp307a1-Bm* の組織別発現パターンと一致しないため、カイコとショウジョウバエでは幼虫期においてエクジソンを合成する経路が一部異なると予想される。

現在、*Cyp307a1* の触媒する反応を明らかにするため、*Cyp307a1* を S2 培養細胞中で発現させ、エクジソン合成経路の中間代謝物と考えられる物質を添加し、その変換を HPLC で確認するという実験を行っている。これまでに cholesterol など、いくつかの候補物質を培地に添加して変換を調べたが、ポジティブな結果は得られていない。

Parental genotypes	F1 phenotypes	
	y+	y
<i>Actin5c-GAL4 spo¹/TM3[y+]</i> x <i>spo¹/TM3[y+]</i>	110	0
<i>UAS-Cyp307a1-Dm-HA spo¹/TM3[y+]</i> x <i>spo¹/TM3[y+]</i>	142	0
<i>UAS-Cyp307a1-Bm-HA spo¹/TM3[y+]</i> x <i>spo¹/TM3[y+]</i>	112	0
<i>Actin5c-GAL4 spo¹/TM3[y+]</i> x <i>UAS-Cyp307a1-Dm-HA spo¹/TM3[y+]</i>	91	35
<i>Actin5c-GAL4 spo¹/TM3[y+]</i> x <i>UAS-Cyp307a1-Bm-HA spo¹/TM3[y+]</i>	132	27

表 1 *Cyp307a1-Dm*、*-Bm* による *spook* 変異系統レスキュー実験の結果

Cyp307a1-Dm、または *Cyp307a1-Bm* を *Actin-5C* ドライバーを用いて、*spook* 変異系統で発現させた結果、y の成虫が羽化したことによって胚期致死の表現型が回復したことがわかる

2. bHLH 型転写因子 *HLH54F*

カイコ組織別 EST データベースを検索することで、前胸腺特異的に発現していると考えられる EST をスクリーニングした。その結果、prgv0048 と呼ばれる EST が前胸腺特異的に発現していることが予想された。既知の EST の塩基配列からカイコ組織別の RT-PCR を行ったところ、prgv0048 は前胸腺特異的に発現していることが明らかになった。

まず prgv0048 の既知の塩基配列を元に 5'RACE を行った結果、prgv0048 の上流には bHLH 型の転写因子がコードされていた。カイコ幼虫の組織別 RNA を用いて Open Reading Frame 部分の発現量を比較すると、カイコ 5 齢幼虫 Wandering 期の幼虫の前胸腺と腸において強い発現が見られ(図 4)、また発生ステージごとに集めた前胸腺由来の RNA を用いて発現量変化を確認したところ、カイコの Wandering 期初期に発現量が上昇することが観察された(図 5)。この結果から、prgv0048 はエクジソン合成に関与する可能性が示唆された。

この分子のアミノ酸配列をショウジョウバエデータベースで検索すると、ショウジョウバエの bHLH 型転写因子である *HLH54F* と相同性が比較的高いことがわかったが、ショウジョウバエ *HLH54F* の機能はこれまでわかっていない。そこで、ショウジョウバエで *HLH54F* の機能解析を行うため、まず *in situ* ハイブリダイゼーションで発現部位を調べた。その結果、*HLH54F* は 3 齢幼虫の前胸腺細胞では特異的な発現は見られなかったが、胚期の前胸腺細胞と腸で特異的な発現

が見られた。この発現パターンは、*HLH54F* がショウジョウバエの胚期でのエクジソン合成に関与している可能性を示唆している。さらに遺伝学的な解析を行うため、Gal4/UAS系を用いて野生型 *HLH54F* を胚の前胸腺細胞で過剰発現させたところ、孵化後 48 時間から 120 時間の間に致死の表現型を示した。

現在、*HLH54F* を過剰発現させた系統を用いて、この致死表現型がエクジソン合成不全によるものなのかどうかを調べている。

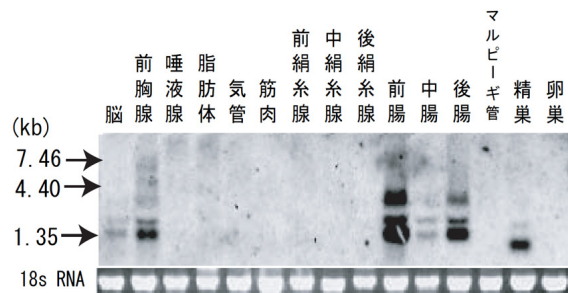


図 4 カイコ 5 齢幼虫の組織別 *HLH54F* 発現解析
(ノーザンブロットング)

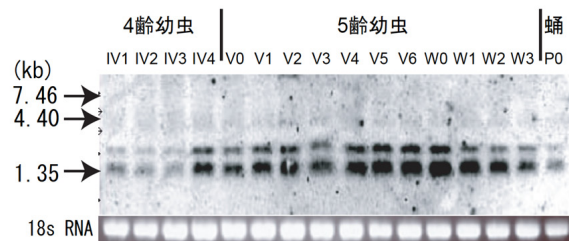


図 5 カイコ幼虫発生段階別 *HLH54F* 発現解析
(ノーザンブロットング)

結論

これまで述べたように、本研究から以下のことが明らかになった。

- ・ ショウジョウバエ、およびカイコの *Cyp307a1* が、エクジソン合成不全と胚期致死を示すショウジョウバエ変異系統 *spook* の表現型を回復できた。すなわち *Cyp307a1* と *spook* が同一遺伝子であることが証明された。
- ・ カイコの *Cyp307a1* は幼虫の前胸腺特異的に発現するが、ショウジョウバエの *Cyp307a1* は初期胚の羊漿膜と、成虫の卵巣での発現しか確認されていないので、両種の幼虫期におけるエクジソン合成系に違いがある可能性を提示した。
- ・ 脱皮変態にかかわる新たな遺伝子の候補として *HLH54F* を提示した。

本研究で同定した遺伝子の解析によって、昆虫の脱皮変態を制御する機構に関して新たな遺伝学的、分子生物学的な知見を提供することができた。これらの成果から、ステロイドホルモン合成の制御や生物の成長を調節する遺伝子ネットワークについての研究がさらに進展することを期待している。